

**DRUG HAVING NEUROCYTE DEATH CONTRASTIMULUS AND METHOD FOR SCREENING THE SAME**

Patent Number: JP2001255318

Publication date: 2001-09-21

Inventor(s): HOSHI MINAKO

Applicant(s): MITSUBISHI CHEMICALS CORP

Requested Patent: ☐ JP2001255318Application  
Number: JP20000064984 20000309

Priority Number(s):

IPC Classification: G01N33/15; A61K31/519; A61K45/00; A61P25/28; A61P43/00; C07D487/04;  
C12Q1/02; G01N33/50

EC Classification:

Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for accurately screening a drug having neurocyte death contrastimulus using amyloid & beta protein having high toxicity equal to the toxicity of self-association type amyloid & beta protein present in the living body of a patient suffering from Alzheimer's disease or the like.

**SOLUTION:** The method for screening the drug includes a process (1) for culturing nerve cells or a nerve organ in the presence of self-association type amyloid & beta protein having high toxicity, which is obtained by convicting an aqueous solution containing amyloid & beta protein, and a substance to be examined and a process (2) for judging that the substance to be examined has inhibiting action with respect to neurocyte death when the death of the neurocytes or neural organ is inhibited.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-255318  
(P2001-255318A)

(43)公開日 平成13年9月21日(2001.9.21)

(51)IntCl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/519		A 6 1 K 31/519	4 B 0 6 3
45/00		45/00	4 C 0 5 0
A 6 1 P 25/28		A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7 4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-64984(P2000-64984)

(22)出願日 平成12年3月9日(2000.3.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 1999年10月23日～10月28日 開催の「SOCIETY FOR NEUROSCIENCE PROGRAM 29TH ANNUAL MEETING」において文書をもって発表

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 星 美奈子

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学  
学生命科学研究所内

(74)代理人 100096219

弁理士 今村 正純 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経細胞死抑制作用を有する薬剤及びそのスクリーニング方法

(57)【要約】

【課題】 アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と同等の高い毒性を有するアミロイドβ蛋白質を用いて、精度よく神経細胞死抑制作用を有する薬剤をスクリーニングする方法を提供する。

【解決手段】 神経細胞死抑制作用を有する薬剤のスクリーニング方法であって、下記の工程：(1)アミロイドβ蛋白質を含む水溶液を対流させることなどにより得られる高い毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質及び被検物質の存在下で神経系細胞又は神経系器官を培養する工程；及び(2)上記神経系細胞又は神経系器官の細胞死が抑制された場合に上記被検物質が神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定する工程を含む方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 神経細胞死抑制作用を有する薬剤のスクリーニング方法であって、下記の工程：

(1) アミロイドβ蛋白質を含む水溶液を対流させることにより得られる、又はアミロイドβ蛋白質を含む水溶液中にアミロイドβ蛋白質の凝集媒体を添加することにより得られる高い毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質及び被検物質の存在下で神経系細胞又は神経系器官を培養する工程；及び(2) 上記神経系細胞又は神経系器官の細胞死が抑制された場合に上記被検物質が神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定する工程を含む方法。

【請求項2】 アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と実質的に同等の毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質の存在下で行う請求項1に記載の方法。

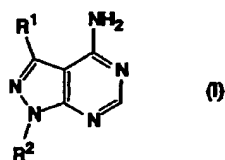
【請求項3】 その毒性がアルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と実質的に同等の濃度で神経系細胞に細胞死を誘発するのに十分な毒性である自己会合型アミロイドβ蛋白質の存在下で行う請求項1に記載の方法。

【請求項4】 請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法によりスクリーニングされた神経細胞死抑制作用を有する化合物又はその塩。

【請求項5】 請求項4に記載の化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含むアルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬。

【請求項6】 下記の一般式(I)：

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>はハロゲン原子及びC<sub>1-6</sub>アルキル基からなる群から選ばれる1又は2以上の置換基を有していてもよいフェニル基を示し；R<sup>2</sup>は水素原子又はC<sub>1-6</sub>アルキル基を示す)で表される神経細胞死抑制作用を有する化合物又はその塩。

【請求項7】 請求項6に記載の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩を含む神経細胞死抑制剤。

【請求項8】 請求項6に記載の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含むアルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、高い毒性を有する

自己会合型アミロイドβ蛋白質を用いた神経細胞死抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法、並びに該方法でスクリーニングされた神経細胞死抑制作用を有する化合物又はその塩、及び該化合物又はその塩を有効成分として含むアルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】アミロイドβ蛋白質はアミノ酸約40残基の非常に凝集性の高い蛋白質であり、アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)の主要な病理学的変化のひとつである老人斑の主要な構成成分である。また、この蛋白質は、突然変異によって早期発症型アルツハイマー病の原因遺伝子となるアミロイド前駆体蛋白質(APP)からプロテアーゼによるプロセッシングにより産生されることが判明している(Kang, J. et al., Nature, 325, 733-736 (1987); Goldgaber, D. et al., Science, 235, 877-880 (1987); Robakis, N. K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4190-4194 (1987))。

【0003】このプロセッシングによりアミロイドβ蛋白質は水溶性のペプチドとして細胞外に放出されるが、その状態では神経細胞死誘発活性(以下、本明細書において神経細胞死誘発活性を「毒性」と称することがある。)を発揮せず、自己会合してアミロイドβ線維を形成することにより初めて毒性を獲得することが知られている(Lorezo, A. and Yanker, B. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 12243-12247 (1994))；以下、自己会合して毒性を示すアミロイドβ蛋白質を「自己会合型アミロイドβ蛋白質」又は「毒性アミロイドβ蛋白質」と呼ぶ場合がある。)。Lorezoらの方法は、アミロイドβ<sub>1-40</sub>を超純水に700μMになるように溶解し、同量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で塩濃度を調節した後、37℃で5日間インキュベートする工程を含んでいる。アミロイドβ<sub>1-42</sub>を用いる場合には、超純水に350μMになるように溶解し、37℃で3日間インキュベートする工程を含む。

【0004】この自己会合型アミロイドβ蛋白質を神経系の培養細胞に高濃度で添加すると細胞を死に至らしめることができることから、アルツハイマー病においては自己会合して毒性を獲得した自己会合型アミロイドβ蛋白質が神経変性を誘発していると考えられている。従って、自己会合型アミロイドβ蛋白質の添加により神経系細胞等に細胞死を誘発する実験系は、アルツハイマー病における生体内での神経細胞死を反映していると考えることができ、神経細胞死の抑制剤のスクリーニング系などに有用である。

【0005】しかしながら、上記のLorezoらによ

る細胞死を誘発する系において用いられた自己会合型アミロイドβ蛋白質はその毒性が低く、試験管内で神経細胞死を誘発するために必要な濃度は、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する毒性アミロイドβ蛋白質の1,000倍以上であった。また、上記の方法では毒性を有するアミロイドβ蛋白質含有液が再現性よく調製できず、調製された毒性を有するアミロイドβ蛋白質含有液を保存すると、ある期間を過ぎて毒性が失われるという問題もあった。

【0006】従来、神経細胞死の抑制剤をスクリーニングする方法として、上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質を用いてインビトロでスクリーニングを行う方法が採用されているが、上記の理由から、この方法では生体内の環境とは大きく乖離した条件を適用するものであり、精度のよいスクリーニング方法であるとは言いがたい。このため、生体内に存在する毒性アミロイドβ蛋白質と同等の毒性を有する自己会合型アミロイドを用いて、生体内環境により近い条件で精度よくスクリーニングを行う方法の開発が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と同等の高い毒性を有し、かつその毒性が維持される自己会合型アミロイドβ蛋白質を用いて、生体内環境により近い条件で精度よくスクリーニングを行う方法を提供することにある。また、本発明の別の課題は、上記の方法によりスクリーニングされた神経細胞死の抑制剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アミロイドβ蛋白質を含む水溶液を対流させて一定時間処理することにより、あるいは該水溶液中にアミロイドβ蛋白質の凝集媒体を添加することによりアミロイドβ蛋白質の自己会合を誘起させることによってアミロイドβ蛋白質の自己会合を再現性よく誘発できること、及びこの処理によって得られる自己会合型アミロイドβ蛋白質が生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と同等の高い毒性を有しており、かつその毒性が長期にわたって保持されることを見いだした。さらに、本発明者らは、上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質を用いることによって、生体内環境により近い条件で精度よく神経細胞死の抑制剤をスクリーニングできることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0009】すなわち、本発明は、神経細胞死抑制作用を有する薬剤のスクリーニング方法であって、下記の工程：

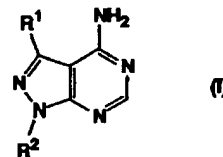
(1)アミロイドβ蛋白質を含む水溶液を対流させることにより得られる、又はアミロイドβ蛋白質を含む水溶液中にアミロイドβ蛋白質の凝集媒体を添加することにより得られる高い毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質及び被検物質の存在下で神経系細胞又は神経系器官を培養する工程；及び(2)上記神経系細胞又は神経系器官の細胞死が抑制された場合に上記被検物質が神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定する工程を含む方法を提供するものである。

【0010】この方法の好ましい態様によれば、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と実質的に同等の毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質の存在下で行う上記の方法；その毒性がアルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と実質的に同等の濃度で神経系細胞に細胞死を誘発するのに十分な毒性である自己会合型アミロイドβ蛋白質の存在下で行う上記の方法が提供される。

【0011】別の観点からは、上記の方法によりスクリーニングされた神経細胞死抑制作用を有する化合物又はその塩；上記の化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含む神経細胞死抑制剤；上記の化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含むアルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬が本発明により提供される。

【0012】また、上記スクリーニングにより神経細胞死の抑制作用を有すると判定される化合物の代表例として、下記の一般式(I)：

【化2】



(式中、R<sup>1</sup>はハロゲン原子及びC<sub>1-6</sub>アルキル基からなる群から選ばれる1又は2以上の置換基を有していてもよいフェニル基を示し；R<sup>2</sup>は水素原子又はC<sub>1-6</sub>アルキル基を示す)で表される神経細胞死抑制作用を有する化合物又はその塩が本発明により提供される。

【0013】また、本発明により、上記の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含む神経細胞死抑制剤；上記の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含むアルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬；上記の医薬の製造のための上記の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩の使用；神経系細胞の神経細胞死の抑制方法であって、上記の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；並びにアルツハイマー病の予防及び／又は治療方法であって、上記の一般式(I)で表される化合物又は生理学的に許容されるその塩の予防及び／又は治療有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を

含む方法が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明のスクリーニング方法に用いられる自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質の調製原料として使用されるアミロイド $\beta$ 蛋白質の種類は特に限定されない。アミロイド $\beta$ 蛋白質は、約40のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、アミロイド前駆体蛋白質（APP）からプロテアーゼによるプロセッシングで産生される。このプロテアーゼの種類やその後の修飾によってさまざまな種類が存在することが知られているが、分泌直後にはC末端のアミノ酸残基の長さの違いによりアミロイド $\beta$ 40（A $\beta_{1-40}$ ）とアミロイド $\beta$ 42（A $\beta_{1-42}$ ）が存在する。

【0015】本発明のスクリーニング方法に用いられる自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質の調製には、例えば、分泌直後のアミロイド $\beta$ 蛋白質の全長の分子種であるアミロイド $\beta$ 40（A $\beta_{1-40}$ ：配列番号1）若しくはアミロイド $\beta$ 42（A $\beta_{1-42}$ ：配列番号2）、又はそれらの変異体、あるいはそれらの誘導体が好ましく用いられる。アミロイド $\beta$ 蛋白質は、ペプチド合成機などを用いて合成したもの、市販のもの、又は生体内から抽出精製したもの、いかなるものを用いてもよい。アミロイド $\beta$ 蛋白質の合成、抽出精製は、それ自体公知の通常用いられている方法で行うことができる。合成ペプチド等の精製は高速液体クロマトグラフィにおいて単一のピークが得られる程度行えば十分であるが、精製方法として、例えば、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィ等が用いられる。

【0016】本発明のスクリーニング方法に用いられる自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質の調製は、通常、このようにして得られたアミロイド $\beta$ 蛋白質を滅菌精製水に溶解し、得られた溶液を惹起して維持することにより行われる。溶解に用いる滅菌精製水の量は、アミロイド $\beta$ 蛋白質が溶解する範囲であればよいが、好ましくは水溶液中のアミロイド $\beta$ 蛋白質の濃度が50nM～2mM、好ましくは1 $\mu$ M～1mM、さらに好ましくは100～700 $\mu$ Mとなる範囲である。この溶液を適当な塩濃度に調節することが望ましい。塩濃度は、アミロイド $\beta$ 蛋白質が溶解される範囲であればいかなるものでもよいが、例えば、最終pHが3～12、好ましくは5～10で、塩が1M以下であることが好ましい。このような塩濃度に調節する方法として、例えば、PBS（－）をアミロイド $\beta$ 蛋白質水溶液と等量加える方法が用いられる。溶解の方法はアミロイド $\beta$ 蛋白質が適当な量の適当な塩濃度の溶液に完全に溶解する方法であれば特に制限はない。

【0017】上記水溶液中のアミロイド $\beta$ 蛋白質を自己会合させるために上記水溶液を対流させるが、対流の流速及び維持時間は、水溶液中のアミロイド $\beta$ 蛋白質が自己会合し、アルツハイマー病の患者の生体内における毒

性アミロイド $\beta$ 蛋白質と同等の濃度で神経細胞死を誘導する活性を有するようになるものであれば特に制限はない。ここで、アミロイド $\beta$ 蛋白質の自己会合とは、該蛋白質の2分子以上が共有結合以外の分子間相互作用によって結合し、1個の分子のように行動する現象を意味しており、通常は、さらに多数の分子が会合することにより、顆粒状、線維状等の分子が形成され、その結果としてアミロイド $\beta$ 蛋白質の毒性が獲得される。

【0018】例えば、アミロイド $\beta$ 蛋白質水溶液を含む容器を、適当な温度範囲中で一定時間、適当な速度で回転し続ける方法が有効である。また、アミロイド $\beta$ 蛋白質水溶液が常に対流し、かつ疎水性の界面に接触する状態を維持させてもよい。例えば、超音波分散機やスターラー等で該水溶液を攪拌する方法、またはアミロイド $\beta$ 蛋白質水溶液を適当な流速で疎水性チューブ内で対流させる方法等も挙げられる。

【0019】また、アミロイド $\beta$ 蛋白質水溶液中にアミロイド $\beta$ 蛋白質の凝集媒体を添加する方法では、凝集媒体としてポリエチレングリコール（PEG：分子量3000～6000程度のもの）などを添加し、1M以下程度の適当な塩濃度の存在下で静置することによる方法が挙げられる。アミロイド $\beta$ 蛋白質の自己会合を誘起する凝集媒体としては、一般的に、蛋白質の結晶化を誘起する物質を用いることができる。例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化カルシウム、ギ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸リチウムセチルトリメチルアンモニウム塩、リン酸ナトリウム、リン酸カリウムなどの無機塩類；PEG100、PEG4000、PEG6000、PEG10000などのポリエチレングリコール類；アセトニトリル、アセトン、イソプロパノール、エタノール、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、ブタノール、1，3-ブチラクトン、1，3-プロパンジオール、2，5-ヘキサジオール、メタノール、2-メチル-2，4-ペンタジオールなどの有機溶媒を挙げることができる。凝集媒体の添加方法としては、一般的に蛋白質の結晶化に用いられる添加方法を採用することができる。これらの技術については、例えば、「生命科学のための結晶解析入門—タンパク質結晶解析のてびき、平山令明著、丸善株式会社」などに記載されている。

【0020】対流を維持するにあたり一定温度を維持することが望ましいが、その温度範囲はアミロイド $\beta$ 蛋白質が変性しない範囲であれば特に制限はない。具体的には4～50℃、好ましくは4～40℃、さらに好ましくは4～37℃の範囲が挙げられる。容器に回転を加え続ける方法としては、アミロイド $\beta$ 蛋白質の水溶液を含む容器を回転培養機、攪拌機、振とう機等を用いて回転さ

せる方法が用いられるが、この中で回転培養器を用いるのが最も好ましい。回転速度は、通常200rpm以下、好ましくは5～50rpm、さらに好ましくは20～40rpmで行われる。また、回転を維持する時間は、水溶液中のアミロイドβ蛋白質が自己会合して十分な毒性を獲得するまで行われるが、具体的には回転の速度等の条件により4時間～7日程度行われる。

【0021】アミロイドβ蛋白質水溶液を充填する容器としては、アミロイドβ蛋白質以外の蛋白質の混入が防げるものであればいかなるものでもよいが、一般的には、蛋白質が吸着しない素材の容器が望ましい。具体的には、プラスチック容器や、市販のエッペンドルフチューブ等がさらに望ましい。容量にも特に制限はない。また、他の蛋白質の混入を防ぐために、容器をあらかじめオートクレーブ等を用いて滅菌しておくことは効果的である。容器に充填するアミロイドβ蛋白質水溶液の量は、容器の全容積の30～90%、さらには50～80%が望ましい。容器中でアミロイドβ蛋白質水溶液に十分な対流を惹起させ、その対流を一定に維持することが望ましい。

【0022】このようにして得られた自己会合型アミロイドβ蛋白質は、このままでも神経系細胞に細胞死を誘導することができ、本発明のスクリーニング方法にそのまま供することが可能である。もっとも、本発明のスクリーニング方法に使用するにあたり、らにアミロイドβ線維を取り除く等の精製を行ってもよい。精製の方法としては、自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を遠心分離してその上清を分取する方法や、例えば0.45μm以上の孔径を有するフィルター（例えば0.65μmのフィルターと30kダルトン以上の分子量の物質をカットするフィルターとの組み合わせなど）で線維を除去する方法、LPFFD（βシート破壊ペプチドiAβ5、ペプチド研究所；アミノ酸配列は一文字標記で示した）やKLVEF（アミノ酸配列は一文字標記で示した）等のβシート破壊ペプチドで線維を分解して取り除く方法、ゲル濾過なども用いることが可能である。

【0023】本発明のスクリーニング方法は、下記の工程；

(1)アミロイドβ蛋白質を含む水溶液を対流させることにより得られる、又はアミロイドβ蛋白質を含む水溶液中でアミロイドβ蛋白質の結晶化を誘起させることにより得られる高い毒性を有する自己会合型アミロイドβ蛋白質及び被検物質の存在下で神経系細胞又は神経系器官を培養する工程；及び(2)上記神経系細胞又は神経系器官の細胞死が抑制された場合に上記被検物質が神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定する工程を含むことを特徴としている。

【0024】本発明の方法に用いられるスクリーニング系では、被検薬物の非存在下において、上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質により神経系細胞又は神経系器官

の細胞死が誘導されるように調整する必要がある。本発明のスクリーニング方法において、自己会合型アミロイドβ蛋白質により誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、用いられる細胞としては、神経系細胞であれば特に制限はなく、哺乳動物（ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ等）由来の神経系細胞や、これらの細胞に分化が可能な細胞等でもよい。また、初代培養細胞又は樹立培養株のいずれでもよい。初代培養細胞としては、上記した動物の海馬、および前脳基底野等から取得したものが好ましく、樹立培養株としては、例えば、PC-12細胞（ATCC CRL-1721）、B103（Schubert, D. et al., *Nature*, 249 (454), 224-227 (1974)）等が好ましい。また上記動物の海馬等の器官をそのまま用いることも可能である。

【0025】これらの細胞や器官は、通常の培養法により培養することができる。具体的には、神経系細胞の初代培養、および神経系細胞の培養方法としては、Hoshi, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 2719-2723 (1996)、およびSahubert, D. et al., *Nature*, 249 (454), 224-227 (1974)に記載されている方法等を用いることができ、器官培養は、Gary Banker and Kimberly Goslin, *Culturing nerve cells*, 2nd Edition, MIT Press, Cambridge (1998)に記載された方法等を用いることができる。このようにして培養された神経系細胞および神経系器官に細胞死を誘導するために添加する上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質の量は適宜選択可能であるが、通常、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する毒性アミロイドβ蛋白質と実質的に同等の濃度で細胞死を誘導できる。例えば、初代培養( $1.25 \times 10^6$ 個/ml)あたり10nM以上、400μm海馬スライス/1ml培養液あたり100pM以上などの量で細胞死を誘導できる。もっとも、上記の濃度は例示のためのものであり、この量に限定されることはない。

【0026】上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質によって誘導される神経系細胞又は神経系器官の細胞死は、通常の場合、本発明の自己会合型アミロイドβ蛋白質の有効量を添加した後、約6時間程度から起こり、48時間程度の後には顕著な細胞死の様子が観察できる。これらの細胞死を測定する方法としては、通常用いられる細胞死検出法を用いることができる。具体的には、被検体が細胞の場合、MTTアッセイ（Mossmann, T., *J. Immunol. Methods*, 65, 55, (1983)、またはトリパンブルーダイエクスクルージョン法（Woo, K. B., W. K. Funkhouser, C. Sullivan, and O. Ala

baster, Cell Tissue Kinet., 13(6), 591-604 (1980)), プロピディウムイオダイド等による染色法などが用いられ、器官スライス等の場合にはプロピディウムイオダイド等による染色法等が用いられる。

【0027】上記の培養系に被検薬物を添加し、神経系細胞又は神経系器官の細胞死が抑制された場合には、その被検薬物が神経細胞死に対する抑制作用を有すると判定することができる。例えば、神経系細胞または神経系器官の培養液に予め被検物質を添加した後、上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質を添加し、あるいは神経系細胞または神経系器官の培養液に上記の自己会合型アミロイドβ蛋白質を添加した後に被検物質を添加して、該神経系細胞や組織の細胞死が被検薬物により抑制されるかを検出すればよい。

【0028】本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された化合物は、アルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬の有効成分として有用である。このような化合物の代表例として、Genistein、Damnacanthol、PP1、PP2（以上、いずれもCalbiochem社より入手可能である）などのチロシンキナーゼの阻害剤を例示することができるが、好ましくはSrcファミリーチロシンキナーゼの阻害剤を例示することができ、さらに好ましくは上記一般式(I)で表される化合物を挙げることができる。もっとも、本発明のスクリーニング方法で神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定される化合物は上記したチロシンキナーゼの阻害剤、Srcファミリーチロシンキナーゼの阻害剤、及び上記式(I)で表される化合物に限定されることはなく、上記スクリーニングの結果物として神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された化合物は、いずれも本発明の範囲に包含される。

【0029】一般式(I)中、R<sup>1</sup>はハロゲン原子及びC<sub>1-6</sub>アルキル基からなる群から選ばれる1又は2以上の置換基を有していてもよいフェニル基を示し；R<sup>2</sup>は水素原子又はC<sub>1-6</sub>アルキル基を示す。R<sup>2</sup>が示すC<sub>1-6</sub>アルキル基としては直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよく、より具体例には、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、イソブチル基、シクロブチル基、シクロプロピルメチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを挙げることができる。R<sup>1</sup>が示すフェニル基上に置換する置換基はハロゲン原子及びC<sub>1-6</sub>アルキル基からなる群から選ばれ、その個数及び置換位置は特に限定されない。環上に置換するハロゲン原子は、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、アルキル基としては上記R<sup>2</sup>について説明したものをを用いることができ、好ましくはC<sub>1-4</sub>アルキル基である。

【0030】上記一般式(I)において、R<sup>1</sup>としてはp-クロロフェニル基又はp-メチルフェニル基が好ましく、R<sup>2</sup>としてはtert-ブチル基が好ましい。最も好ましい化合物は、4-アミノ-5-(4-クロロフェニル)-7-(tert-ブチル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、又は4-アミノ-5-(4-メチルフェニル)-7-(tert-ブチル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンである。この化合物はHanke, J.H., et al., J. Biol. Chem., 271, 695, 1996に記載されており、Calbiochem社から市販品を入手可能である。また、一般式(I)で表される化合物は米国特許第5,593,997号明細書に記載された方法で容易に製造することが可能である。

【0031】本発明により提供される医薬は、本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された化合物、好ましくは上記式(I)で表される化合物及び生理学的に許容されるその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を有効成分として含み、アルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬として用いることができる。上記式(I)で表される化合物の生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩などの鉱酸類の塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などの有機酸の塩、グリシンなどのアミノ酸の塩などを挙げることができる。上記式(I)で表される化合物は置換基の種類に応じて、1又は2以上の不斉炭素を有する場合があるが、任意の光学活性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを上記医薬の有効成分として用いてもよい。

【0032】本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された化合物、好ましくは上記式(I)で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの水和物若しくはそれらの溶媒和物は、それ自体を医薬として患者に投与してもよいが、一般には、これらの有効成分の1種または2種以上を含む医薬組成物を製造して患者に投与することが好適である。このような医薬組成物として、錠剤、カプセル剤、細粒剤、散剤、丸剤、トローチ、舌下剤、又は液剤などの経口投与の製剤、あるいは注射剤、座剤、軟膏、貼付剤などの非経口投与用の製剤を例示することができる。

【0033】経口投与用の錠剤又はカプセル剤は、通常は単位投与物として提供され、結合剤、充填剤、希釈剤、打錠剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味剤及び湿潤剤のような通常の製剤用担体を添加して製造することができる。錠剤は、この当業界で周知の方法に従って、例えば、腸溶性コーティング剤を用いてコーティングすることができ、例えばセルロース、マンニトール、又はラクトース等の充填剤；澱粉、ポリビニルポリピロリドン、澱粉誘導体、又はナトリウム澱粉グリコラート等の

崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；ラウリル硫酸ナトリウム等の湿潤剤を用いて製造してもよい。

【0034】経口投与用の液剤は、例えば水性又は油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤又はエリキシル剤等の他、使用前に水又は適当な媒体により再溶解される乾燥製剤として提供される。このような液剤には、通常の添加剤、例えばソルビール、シロップ、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル又は水素化食用脂肪のような沈殿防止剤、レシチン、ソルビタンモノオレート、アラビアゴムのような乳化剤、アーモンド油、精製ココナツ油、油状エステル（例えばグリセリンのエステル）、プロピレングリコール、エチルアルコールのような（食用油も包含する）非水性媒体、*p*-ヒドロキシ安息香酸のメチルエステル、エチルエステル、もしくはプロピルエステル、又はソルビン酸のような保存剤及び必要に応じて通常の香味剤又は着色剤を配合することができる。

【0035】経口投与剤の製剤は、混合、充填、又は打錠などの当業界で周知の方法により製造することができる。また、反復配合操作を用いて多量の充填剤等を使用した製剤中に有効成分を分布させてもよい。非経口投与用の製剤は、一般には有効成分である化合物と滅菌媒体とを含有する液体担体投与量製剤として提供される。非経口投与用の溶剤は、通常、化合物を媒体に溶解させて滅菌し、次に適当なバイアル又はアンプルに充填して密封することにより製造される。安定性を高めるために組成物を凍結させた後にバイアル中に充填し、水を真空下で除去してもよい。非経口懸濁液は実質的に非経口溶液の場合と同じ方法で製造されるが、有効成分を媒体に懸濁させてエチレンオキシド等により滅菌することにより好適に製造できる。また、有効成分が均一分布となるように必要に応じて界面活性剤、湿潤剤等を添加してもよい。

【0036】有効成分である上記式(I)の化合物の投与量は、治療や予防の目的、患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定すればよいが、通常の場合、成人一日あたり経口投与により0.05~30mg/kg程度を投与することができる。このような投与量を1日あたり1~数回に分けて投与するのが望ましい。

【0037】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液の調製

(1) アミロイドβ(Aβ<sub>1-40</sub>：配列番号1)樹脂の製造

Fmoc-Val樹脂342mg(アミン含量0.73mmol/g樹脂)をパーキンエルマーアブライドバイオシステムズ社製A433型自動ペプチド合成機にセッ

トし、これにFmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OHを供給し、HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]を縮合剤として順次縮合させて上記の側鎖保護アミロイドβ(Aβ<sub>1-40</sub>)樹脂1.515gを得た。

【0038】(2)トリフルオロ酢酸処理

上記(1)で得た側鎖保護アミロイドβ(Aβ<sub>1-40</sub>)樹脂中の304mgを採取し、これにフェノール0.75mlとチオアニソール0.5mlとトリフルオロ酢酸8.25mlとエタンジチオール0.25mlと蒸留水0.5mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で1.5時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル200mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後、35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(約200ml)で抽出処理してH-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OHで表される粗ペプチド191mgを得た。

【0039】(3)ペプチドの精製

この粗ペプチドを35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(40ml)に溶解しODS(オク

タデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径2cm、長さ25cm)を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を22%から42%へ直線的に20分間で上昇させることによりおこなった。精製物の収量は35mgであった。本物質の構造はMALDI-TOF質量分析により確認された。測定値[M+H]+4330.99、計算値(C<sub>194</sub>H<sub>295</sub>N<sub>53</sub>O<sub>58</sub>S<sub>1</sub>+H)4330.89。

【0040】(4)自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液の調製

上記(3)で精製を行ったアミロイドβ蛋白質0.4μmolを1.5ml容量のエピペンドルフチューブに入れ、これに532μlの超純水と532μlのPBS(SIGMA社製)を順次加え、アミロイドβ蛋白質を完全に溶解させた。このアミロイドβ蛋白質水溶液の入ったエピペンドルフチューブをダックローター(TAITEC社製、ローター:RT50)に取り付け、37℃において35rpmの速度で7日間回転させた。

【0041】例2:自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液の毒性の検定

(1)初代培養細胞の調製

ラット18日胎児(2腹分)の前脳基底野より分散培養によって初代培養細胞を調製した。この初代培養細胞をポリエリジン(ナカライテスク社製)によりコーティングした24ウェルプラスチック細胞培養プレート中で培養した。コーティングは0.5mgポリエリジン/1ml 0.15Mホウ酸バッファー(pH8.3)のポリエリジン溶液に培養プレートを1晩浸漬した後、滅菌精製水で洗浄し、自然乾燥させて行った。初代培養細胞は培養プレート1ウェルの底面積に対して、3×10<sup>5</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度となるように、5%牛胎児血清(ハイクローン社製)/5%馬血清(ライフテックオリエンタル社製)1mMPyruvate/50μg/ml Gentamicin(ライフテックオリエンタル社製)/DMEM high glucose培地(ライフテックオリエンタル社製)で調製した。培養は37℃、10%CO<sub>2</sub>中で4日間行った。

【0042】(2)自己会合型アミロイドβ蛋白質の添加

上記(1)で得られた初代培養細胞について、培養液をB27(ライフテックオリエンタル社製)、Neuro basal(ライフテックオリエンタル社製)、0.5mM L-Glutamine、50μg/ml Gentamicin(ライフテックオリエンタル社製)培地0.5ml/1ウェルに交換した。培地交換後、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で3日間さらに培養を行った。この培養細胞に対し、例1で得られた自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を最終アミロイドβ蛋白質濃度が1、2、5、10μM/1ウェル、またコントロールとして

PBS/H<sub>2</sub>Oを等容量2ウェルのそれぞれ細胞外液に添加した。添加後、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で16時間培養を行った。

【0043】(3)MTT活性測定

上記(2)で自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を添加していない2ウェルのうちの1つにTriton X-100を最終濃度が0.1%となるように添加し、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で10分間培養した。このようにして毒性アミロイドβ蛋白質含有液を添加した4ウェル、コントロールの1ウェル、及びTriton X-100を添加してウェル内の培養細胞を死滅させた1ウェルの計6ウェルについて培地を除去し、250μg MTT(シグマ社製)/PBS50μlを注入した。これらを37℃、10%CO<sub>2</sub>中で3時間培養した後、20% SDS(ナカライテスク社製)、50% DMF(dimethylformamide)pH3.5/H<sub>2</sub>Oを50μl添加した。これをさらに37℃、10%CO<sub>2</sub>中で2時間静置し、細胞を完全に融解させた。この各ウェル中の細胞融解液について570nmの吸光度を測定した。この570nmの吸光度について、Triton X-100を加えて細胞をすべて死滅させたウェルにおける値をバックグラウンドとして他のウェルにおける値から差し引いた値の結果を図1(白丸)に示した。

【0044】例3:アミロイドβ蛋白質水溶液を回転を加えず調製したアミロイドβ蛋白質含有液の毒性の検定  
アミロイドβ蛋白質を可溶化後、回転を加えないで調製したアミロイドβ蛋白質含有液を用いた他は、例2と同様の実験を行った。結果を図1(黒四角)に示した。例2で得られた結果との比較から、アミロイドβ蛋白質を可溶化後、回転をさせて自己会合型アミロイドβ蛋白質を調製した場合にのみ、神経系細胞に細胞死を誘導する活性を有する毒性アミロイドβ蛋白質を調製できることが明らかになった。

【0045】例4:自己会合型アミロイドβ含有液による神経細胞死のPP2による抑制試験

(1)初代培養細胞の調製

ラット18日胎児(2腹分)の前脳基底野より分散培養によって初代培養細胞を調製した。この初代培養細胞をポリエリジン(ナカライテスク社製)によりコーティングした24ウェルプラスチック細胞培養プレート中で培養した。コーティングは0.5mgポリエリジン/1ml 0.15Mホウ酸バッファー(pH8.3)のポリエリジン溶液に培養プレートを1晩浸漬した後、滅菌精製水で洗浄し、自然乾燥させて行った。初代培養細胞は培養プレート1ウェルの底面積に対して、3×10<sup>5</sup>cells/cm<sup>2</sup>の密度となるように、5%牛胎児血清(ハイクローン社製)/5%馬血清(ライフテックオリエンタル社製)1mMPyruvate/50μg/ml Gentamicin(ライフテックオリエンタル社製)/DMEM high glucose培地

(ライフテックオリエンタル社製)で調製した。培養は37℃、10%CO<sub>2</sub>中で4日間行った。

【0046】(2) 自己会合型アミロイドβ蛋白質の添加

上記(1)で得られた初代培養細胞について、培養液をB27(ライフテックオリエンタル社製)、Neuro basal(ライフテックオリエンタル社製)、0.5mM L-Glutamine、50μg/ml Gentamicin(ライフテックオリエンタル社製)培地0.5ml/1ウェルに交換した。培地交換後、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で3日間さらに培養を行った。この培養細胞のうち3ウェルに対してPP2(4-アミノ-5-(4-クロロフェニル)-7-(ト-ブチル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、カルバイオケム社製: Cat. No. 529573)を最終濃度50nMとなるように添加した。これを37℃、10%CO<sub>2</sub>中で1時間培養した後、例1で得られた自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を最終アミロイドβ蛋白質濃度が0.5、2、5μM/1ウェルとなるように1ウェルずつ、またコントロールとして2ウェルにPBS/H<sub>2</sub>Oを等容量を、それぞれ細胞外液に添加した。添加後、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で16時間培養を行った。また、PP2の代わりにPBSを添加した以外は上記と同様に調製した細胞外液に例1で得られた自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を最終アミロイドβ蛋白質濃度が0.5、2、5μM/ウェルとなるように1ウェルずつ添加した。さらに、コントロールとしてPP2のみを添加したウェルを用意した。

【0047】(3) MTT活性測定

上記(2)で自己会合型アミロイドβ蛋白質含有液を添加していない2ウェルのうちの1つにTriton X-

100を最終濃度が0.1%となるように添加し、37℃、10%CO<sub>2</sub>中で10分間培養した。このようにして毒性アミロイドβ蛋白質含有液を添加した3ウェル、毒性アミロイドβ蛋白質を添加したがPP2を添加していない3ウェル、PP2のみの1ウェル、コントロールの1ウェル、及びTriton X-100を添加してウェル内の培養細胞を死滅させた1ウェルの計9ウェルについて培地を除去し、250μg MTT(シグマ社製)/PBS50μlを注入した。これらを37℃、10%CO<sub>2</sub>中で3時間培養した後、20% SDS(ナカライテスク社製)、50% DMF(dimethyl formamide) pH3.5/H<sub>2</sub>Oを50μl添加した。これをさらに37℃、10%CO<sub>2</sub>中で2時間静置し、細胞を完全に融解させた。この各ウェル中の細胞融解液について570nmの吸光度を測定した。この570nmの吸光度について、Triton X-100を加えて細胞をすべて死滅させたウェルにおける値をバックグラウンドとして、他のウェルにおける値から差し引いた値の結果を図2(白丸)に示した。以上の結果より、毒性アミロイドβ含有液による神経細胞の細胞死はPP2により阻害されることが明らかになった。

【0048】

【発明の効果】本発明のスクリーニング方法では、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合型アミロイドβ蛋白質と同等の高い毒性を有し、かつその毒性が維持される自己会合型アミロイドβ蛋白質を用いることにより、生体内環境により近い条件で精度よくスクリーニングを行うことができる。

【0049】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Agent having inhibitory action on nerve cell death and method for screening said agent

<130> A01091M

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

35

40

<210> 2

&lt;211&gt;; 42

&lt;212&gt;; PRT

&lt;213&gt;; Human

&lt;400&gt;; 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35

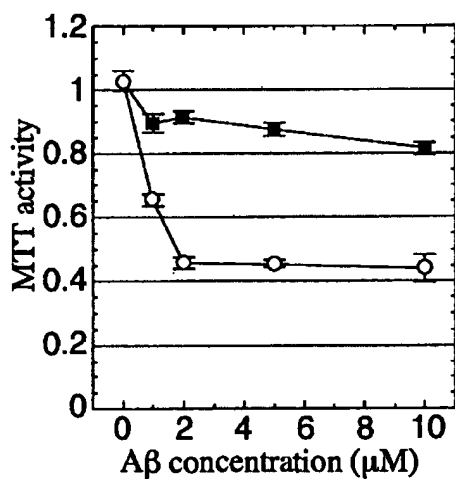
40

## 【図面の簡単な説明】

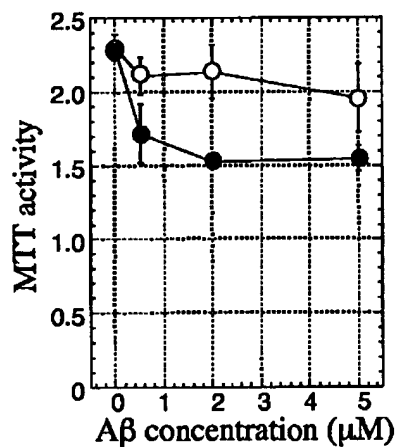
【図1】 本発明のスクリーニング方法で用いる自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質が神経系細胞に細胞死を誘導する高い毒性を有することを示した図である。図中、白丸は本発明のスクリーニング方法に用いる自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質の結果を示し、黒四画はアミロイド $\beta$ 蛋白質の溶液に回転を加えずに調製したアミロイド $\beta$ 蛋白質溶液についての結果を示す。

【図2】 毒性を有する自己会合型アミロイド $\beta$ 蛋白質を添加した神経細胞にPP2を添加することにより、細胞死が抑制された結果を示した図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

C 07 D 487/04

C 12 Q 1/02

G 01 N 33/50

識別記号

143

FI

C 07 D 487/04

C 12 Q 1/02

G 01 N 33/50

テームド (参考)

143

Z

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 CB26  
4B063 QA01 QA07 QA18 QQ61 QR41  
QR48 QR66 QR77 QS07 QS36  
QX01  
4C050 AA01 BB05 CC08 EE04 FF02  
FF05 GG04 HH01  
4C084 AA17 MA01 NA14 ZA162  
ZB222  
4C086 AA01 AA02 CB06 MA01 MA04  
NA14 ZA16 ZB22